



Taq'Ozyme HS Mix

Prémix 2X prêt à l'emploi pour PCR à démarrage à chaud (« Hot Start »)

OZYA006-5 – 5 réactions
OZYA006-200 – 200 réactions
OZYA006-1000 – 1000 réactions
OZYA006-2000 – 2000 réactions
OZYA006-500SP – 500 réactions (avec supplément de H2O RNase-Free)

Stockage et stabilité : **un an à -20°C**

MANUEL D'UTILISATION

OZYME - 10 AVENUE AMPÈRE - CS 30268 - 78053 ST QUENTIN EN YVELINES CEDEX Tél. : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - www.ozyme.fr/info

SOMMAIRE

DESCRIPTIF

Taq'Ozyme HS Mix est un prémix 2X prêt à l'emploi pour la PCR à démarrage à chaud (« Hot-Start »). L'enzyme est inactivée grâce à un anticorps anti-Taq permettant la préparation du mélange réactionnel à température ambiante. Cette caractéristique évite l'amplification des dimères d'amorces et les hybridations non spécifiques à basse température. Grâce à sa formulation spéciale, **Taq'Ozyme HS Mix** est recommandé pour **la PCR en multiplex**, **la PCR rapide** et d'autres applications comme la **PCR sur colonies** et sur **séquences riches en GC**.

Taq'Ozyme HS Mix contient du tampon de réaction, des dNTP, du $MgCl_2$, ainsi que des additifs de stabilisation et des amplificateurs de PCR. Sa composition est confidentielle.

PRÉCAUTIONS

- Éviter les congélations/décongélations répétées.
- Taq'Ozyme HS Mix peut amplifier jusqu'à 5 kb à partir d'ADN génomique humain (6 kb en plasmide). Si besoin, voir section « Produits associés ».

LISTE DES COMPOSANTS

OZYA006– 5 réactions	1 x 125 µl Taq'Ozyme HS Mix 2X
OZYA006-200 – 200 réactions	4 x 1,25 ml Taq'Ozyme HS Mix 2X
OZYA006-1000 – 1000 réactions	5 x 5 ml Taq'Ozyme HS Mix 2X
OZYA006-2000 – 2000 réactions	10 x 5 ml Taq'Ozyme HS Mix 2X
OZYA006-500SP – 500 réactions	10 x 1,25 ml Taq'Ozyme HS Mix 2X
	10 x 1 ml H_2O RNase-Free

PROTOCOLE STANDARD

Ce protocole est adapté pour une réaction de 50 µl à partir de matrices purifiées. Les amorces ont préférentiellement une température de fusion (Tm) proche de 60°C. C'est un point de départ pour les optimisations.

Après décongélation complète de chaque réactif, bien homogénéiser à l'aide d'un vortex ; puis centrifuger brièvement tous les réactifs avant leur utilisation.

1. Les réactifs sont mélangés dans un micro-tube stérile, dans l'ordre suivant :

Réactif	Volume	Concentration finale
H_2O RNase-Free	q.s.p* 50 µl	-
Amorce sens (ex : 20 µM)	1 µl	0,4 µM
Amorce anti-sens (ex : 20 µM)	1 µl	0,4 µM
Matrice d'ADN	Plasmide : 10 ng ADNg : 200 ng ADNc non dilué§ : < 5µl	50 pg à 500 ng/50 µl
Taq'Ozyme HS Mix 2X	25 µl	1X
Volume final	50 µl	

*q.s.p. : quantité suffisante pour
§ : aliquot d'un mélange réactionnel de transcription inverse

2. Le mélange réactionnel est mélangé doucement à l'aide d'un vortex, puis centrifugé brièvement pour rassembler l'échantillon au fond du tube.

3. Programmation du thermocycleur‡ :

Étape	Température	Temps	Nombre de Cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 min§	1
Dénaturation	95°C	15 sec	25-35
Hybridation	55°C*	15 sec	
Élongation	72°C	30 sec§	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

* : ou Tm-5°C sur le Tm le plus bas des deux amorces si le Tm des amorces est différent de 60°C
§ : pour ADNg > 1 kb, une optimisation peut être nécessaire. Voir section "Optimisations".
‡ : un protocole de PCR rapide est disponible dans « Protocoles Spécifiques »

OPTIMISATIONS

Préambule : tester un protocole validé pour un mélange similaire est possible et ne requiert généralement que peu d'optimisation. Nous recommandons de réaliser un gradient de température d'hybridation et de respecter le temps de dénaturation / activation et le temps d'élongation du protocole standard.

Les conditions optimales diffèrent d'une réaction à l'autre et dépendent des matrices et des amorces utilisées. En premier lieu, les variables clés à optimiser pour Taq'Ozyme HS Mix sont : 1. la température d'hybridation des amorces, 2. les concentrations des amorces et 3. la quantité de matrice. Le magnésium et les dNTP sont déjà inclus dans Taq'Ozyme HS Mix en concentrations optimales.

Mélange réactionnel :

Matrice : la quantité optimale de matrice pour une PCR dépend essentiellement du type d'ADN. Nous recommandons pour une réaction de 50 µl les quantités suivantes :

	Plasmide (ou ADN de complexité équivalente)	ADN génomique (ou ADN de compléxité équivalente)
Taq'Ozyme HS Mix	**50 pg-10 ng (commencer avec 10 ng)**	**5-500 ng (commencer avec 200 ng)**

ADNc : prélever un aliquot du mélange réactionnel de transcription inverse. Le volume de celui-ci ne doit pas dépasser 10 % du volume réactionnel de la PCR (5 µl pour une réaction de 50 µl).

IMPORTANT : ne pas utiliser de l'ADN solubilisé dans une solution contenant de l'EDTA (ex : tampon TE), agent chélateur des ions Mg^{2+} libres.

Amorces : la conception et la concentration des amorces sont essentielles au succès de toute PCR.
Nous recommandons des amorces de 18 à 30 nucléotides, contenant 40-60% de GC. Dans la mesure du possible, les températures de fusion (Tm) des deux amorces doivent être les plus proches possibles entre elles et aux environs de 60°C. La méthode la plus simple pour estimer le Tm est : Tm = 2°C x (A+T) + 4°C x (G+C). Des logiciels en ligne d'aide à la conception d'amorces sont très utiles; citons Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3) et visual OMP (http://dnasoftware.com). Les concentrations des cations monovalents et divalents à utiliser pour les calculs des Tm sont respectivement 10 mM et 3 mM.
Les amorces sens et anti-sens sont généralement utilisées à une concentration finale comprise entre 0,2-0,6 µM. Nous recommandons de commencer avec 0,4 µM de chaque amorce (20 pmol de chaque dans 50 µl de mélange réactionnel). Une concentration trop élevée en amorces peut diminuer la spécificité d'hybridation et induire en conséquence des amplifications non spécifiques.

Programmation du thermocycleur :

Nombre de cycles : le nombre de cycles est généralement compris entre 25 et 35 en fonction du nombre de copies de la séquence à amplifier. Augmenter le nombre de cycles ne conduit pas nécessairement à améliorer le rendement d'amplification du fragment d'intérêt. Au-delà d'un certain nombre de cycles, le bruit de fond provenant d'amplifications non spécifiques s'accroît.

Dénaturation initiale / activation de l'enzyme : la dénaturation initiale est nécessaire pour activer l'enzyme et dénaturer efficacement la matrice. Nous recommandons 1 minute à 95°C. Cependant, pour les matrices plus complexes comme l'ADN génomique eucaryote, un temps de dénaturation plus long, mais toujours inférieur à 3 minutes, peut être nécessaire.

Dénaturation : nous recommandons 15 secondes à 95°C pour l'étape de dénaturation. Cette condition convient aux matrices jusqu'à 55% de GC. Il est possible de raccourcir ce temps à 5 secondes pour les amplicons à faible pourcentage de GC (40-45 %) et de le rallonger au delà de 15 secondes pour les amplicons riches en GC (>55 %).

Température et temps d'hybridation : la température d'hybridation optimale dépend des amorces utilisées et de la composition du tampon de réaction. Elle est généralement 2-5°C en-dessous du Tm le plus bas des deux amorces. Dans le protocole standard, nous recommandons des amorces de Tm similaires et le plus proche possible de 60°C (voir section « Amorces » dans ce chapitre). L'hybridation se fait en première instance à 55°C. Si nécessaire, réaliser un gradient de température afin de déterminer la température d'hybridation optimale (entre 45 et 68°C). Suivant les amplifications, le temps d'hybridation, en conditions standard de 15 secondes, peut être réduit jusqu'à 5 secondes.

Température et temps d'élongation : l'élongation se fait à 72°C. Le temps d'élongation dépend de la longueur de l'amplicon et de la complexité de la matrice. En conditions standard, nous recommandons 30 secondes. Ce temps d'élongation est suffisant pour des matrices de faible complexité (plasmide, ADN lambda jusqu'à 5 kb). Pour l'amplification de fragments d'ADN génomique (ou autre matrice de complexité équivalente) de plus de 1 kb, une optimisation peut être nécessaire en incrémentant le temps d'élongation de 10 à 30 sec / kb. Un protocole de PCR rapide est disponible dans « Protocoles Spécifiques »

PROTOCOLES SPÉCIFIQUES

PCR multiplexe :

Mélange réactionnel pour PCR multiplexe :

Réactif	Volume	Concentration finale
H_2O RNase-Free	q.s.p* 25 µl	-
Amorce sens/anti-sens (25 µM)	0,5 µl	0,5 µM
Taq'Ozyme HS Mix 2X	12,5 µl	1X
Matrice d'ADN	x µl**	500 ng/25 µl
Volume final	25 µl	

*q.s.p. : quantité suffisante pour
** : ajuster le volume de matrice d'ADN pour une concentration finale de 500 ng/25 µl

Programmation du thermocycleur pour PCR multiplexe :

Pour réaliser la PCR multiplexe, le protocole en 2 étapes est recommandé. Si toutefois, il est impossible de sélectionner les amorces avec des Tm compatibles avec l'hybridation à 65°C, testez le protocole en 3 étapes ci-après.

- **PCR en 2 étapes :** si les Tm de vos amorces sont compatibles avec l'hybridation à 65°C, nous vous recommandons ce protocole

Étape	Température	Temps	Nombre de Cycles
Dénaturation initiale	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec	25
Hybridation/élongation	65°C	4 min*	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

*Pour la majorité des cas, la durée de 4 minutes est souvent largement suffisante. Si l'objectif est de réduire la durée totale de la PCR, vous pouvez descendre à 1 minute. La réduction est autant plus valable si le nombre de

- **PCR en 3 étapes** : si les Tm de vos amorces ne sont pas compatibles avec notre protocole de PCR en 2

étapes décrit ci-dessus, veuillez-suivre les recommandations suivantes

Programmation du thermocycleur pour PCR multiplexe (en 3 étapes, ≤ 1 kb)

Étape	Température	Temps	Nombre de Cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	25-35
Hybridation	55°C*	15 sec	
Élongation	72°C	90 sec**	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

Des optimisations de ces conditions peuvent être nécessaires. Notamment, la température d'hybridation et le temps d'élongation peuvent être ajustés :
*****Température d'hybridation : nous conseillons d'hybrider à 55°C. En cas de besoin, nous recommandons de réaliser un gradient de température afin de déterminer la température d'hybridation optimale.
******Temps d'élongation : la PCR multiplexe requiert une élongation plus longue. Nous recommandons de commencer par 90 secondes et d'augmenter ce temps si nécessaire.

PCR rapide :

Taq'Ozyme HS Mix peut fonctionner en cycles plus courts de PCR, diminuant ainsi la durée totale de la PCR. Il est plus facile de réaliser une PCR rapide à partir des matrices simples qu'à partir de celles plus complexes. La programmation ci-dessous a été optimisée pour les matrices de faible complexité (ADN de plasmide, ADNg de lambda…). Pour les matrices plus complexes comme ADNg humain ou ADN riche en GC, nous recommandons de démarrer le temps d'élongation à 10 sec / kb, puis de l'augmenter à 15 sec/kb, 20 sec/kb ou 30 sec/kb. Augmentez également si nécessaire la durée de dénaturation et d'hybridation jusqu'à 15 secondes si de l'ADNg humain ou de l'ADN riche en GC servent de matrice.

Programmation du thermocycleur pour PCR rapide :

Étape	Température	Temps	Nombre de Cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 min§	1
Dénaturation	95°C	5 sec	25-35
Hybridation	55°C*	5 sec	
Élongation	72°C	10 sec§	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

* : ou Tm-5°C sur le Tm le plus bas des deux amorces si le Tm des amorces est différent de 60°C.
§ : pour ADNg > 1 kb, une optimisation peut être nécessaire. La vitesse d'élongation dépend aussi de la matrice : il est plus facile de réaliser une PCR rapide à partir d'ADN plasmidique qu'à partir d'ADN génomique.

PCR sur colonie :

OZYME - 10 AVENUE AMPÈRE - CS 30268 - 78053 ST QUENTIN EN YVELINES CEDEX Tél. : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - www.ozyme.fr/info

Taq'Ozyme HS Mix peut être utilisé pour l'amplification d'ADN plasmidique à partir de bactéries en culture liquide ou de colonies sur milieu solide.

- À partir d'une culture liquide : collecter jusqu'à 8 µl de milieu d'une culture ayant poussé la nuit. Ajouter ces 8 µl directement dans un mélange réactionnel de 50 µl final.
- À partir de colonies : nous recommandons de piquer une colonie avec un cure-dent stérile et de la resuspendre directement dans un mélange réactionnel de 50 µl final.

Programmation du thermocycleur pour PCR sur colonie (amplicon ≤ 1 kb)* :

Étape	Température	Temps	Nombre de Cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	25-35
Hybridation	55°C	15 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

* Des optimisations de ces conditions peuvent être nécessaires. Voir section « Optimisations ».

RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

1/ Absence de produits de PCR ou rendement faible

Causes possibles	Remarques / Solutions
Omission des composants / Erreurs de pipetage	• Vérifier la préparation du mélange réactionnel et les volumes utilisés • Vérifier les concentrations/dilutions de tous les composants
Composants défectueux	• Vérifier les conditions de stockage de tous les composants. Si nécessaire, tester chaque composant individuellement • Utiliser de l'ADN purifié (hors PCR sur colonie). Vérifier si l'ADN est dégradé ou endommagé • Vérifier la pureté des amorces
Quantité d'ADN non optimale	• Titrer la quantité de la matrice d'ADN. Augmenter la concentration finale (voir section « Matrice » du chapitre « Optimisations »)
Conditions des cycles PCR non optimales	• Diminuer la température d'hybridation. Idéalement réaliser un gradient pour déterminer la température d'hybridation optimale • Augmenter le temps d'élongation, ou utiliser une enzyme mieux adaptée (voir section « Produits associés ») si la séquence cible est longue • Augmenter le nombre de cycles • Augmenter le temps de dénaturation particulièrement pour les matrices complexes (ADN génomique)

OZYME - 10 AVENUE AMPÈRE - CS 30268 - 78053 ST QUENTIN EN YVELINES CEDEX Tél. : 01 34 60 24 24 - Fax : 01 34 60 92 12 - www.ozyme.fr/info

2/ Bandes multiples ("smear") ou bandes non spécifiques

Causes possibles	Remarques /Solutions
Quantité de matrice non optimale	• Titrer la quantité d'ADN. Diminuer la concentration finale (voir section « Matrice » du chapitre « Optimisations »)
Conditions des cycles PCR non optimales	• Diminuer le nombre de cycles • Diminuer le temps d'élongation • Augmenter la température d'hybridation (accroître la stringence)
Concentrations d'amorces trop élevées	• Diminuer les concentrations des amorces
Contamination	• Remplacer chaque composant afin de trouver la source de contamination • Réaliser les réactions de PCR dans un espace réservé et séparé de celui dédié à l'analyse des produits de PCR
Conception d'amorces non optimale	• Désigner des nouvelles amorces (voir section «Optimisations - Amorces »)

PRODUITS ASSOCIÉS

- Taq'Ozyme - OZYA001-1000
- Taq'Ozyme Purple Mix 2 - OZYA007-200 (avec supplément de $MgCl_2$) (Mélange 2X prêt à l'emploi)
- Taq'Ozyme Purple Mix 2 - OZYA007-200XL (avec supplément de $MgCl_2$) (Mélange 2X prêt à l'emploi)
- Taq'Ozyme Purple Mix 2 - OZYA007-1000 (avec supplément de $MgCl_2$) (Mélange 2X prêt à l'emploi)
- Taq'Ozyme HS – OZYA002-250
- Taq'Ozyme HS – OZYA002-1250
- Takara Ex Taq ou Takara LA Taq (PCR > 5 Kb)
- Advantage-GC2 Polymerase Mix (séquences contenant jusqu'à 90% de GC)
- ExactLadder® DNA PreMix 100 bp Plus - OZYC001-100
- ExactLadder® DNA PreMix 2 Log - OZYC002-100
- ExactLadder PreMix PCR – OZYC004-100
- SeaKem LE Agarose - 500 g - LON50004
- AccuGENE Molecular Biology Water - 1 L - LON51200
- Les thermocycleurs peqSTAR